

мента и того его количества, которое достигло и распределилось в плазме крови [10, 11], в результате нестабильности фермента и короткого периода полужизни. Использование же другого фермента в модели Шелла невозможно, так как она имеет ограничение, заключающееся в условии «специфичности» фермента для пораженного органа. В предложенных нами модели и алгоритме снято ограничение на специфичность фермента, так как алгоритм предусматривает дифференциацию активности ЛДГ в сыворотке крови по органам и тканям, вовлеченным в патологический процесс. Следует отметить, что в предыдущих работах [3, 6, 7, 10, 12], где анализируется возможность использования ЛДГ в клинике в качестве тест-показателя при различных заболеваниях, затруднена интерпретация результатов ввиду широкой распространенности этого фермента в организме. В нашем случае это обстоятельство является удобным фактором, позволяющим выявлять кроме степени поражения органа также и другие органы, затронутые патологическим процессом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абян К. Г., Габриелян Р. С., Наниджян Л. О., и др. Тез. докл. XII Междунар. конф. по электрокардиологии. 39, Минск, 1985.
2. Акопян Ж. И., Зарибян И. М., Казанчян Г. П. Биолог. ж. Армении, 38, 2, 97—105, 1986.
3. Арипянц М. С. Автореф. канд. дисс., Киев, 1973.
4. Бухатова Э. Л. Автореф. канд. дисс., Рига, 1979.
5. Зарибян И. М., Биолог. ж. Армении, 39, 9, 758—763, 1986.
6. Юрков Ю. А., Проблемы медицинской химии, 37—65, М., 1973.
7. Юрков Ю. А., Тамм Л. Д. Педиатрия, 50—55, 2, 1967.
8. Ditz A. A., Lubrano T. Anal. Biochem., 20, 246—257, 1967.
9. Maroko P. R., Libby P., Braunwald E. Amer. J. Cardiol., 32, 7, 930—936, 1973.
10. Shell W. E., Kjekshus S. K., Sobel B. E. J. Clin. Invest., 50, 2614—2624, 1971.
11. Wann J. L., Cobb F. R., McHull P. A., Roe C. R. Circulation, 62, 6, 1239—1247, 1980.
12. Zondag H. A. Determination and diagnostic significance of lactate dehydrogenase isoenzymes. Assen, 1—15, 1963.

Поступило 9.VI 1989 г.

Биол. ж. Армении, № 11 (42), 1989

УДК 577.1.576.8.097

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ИЗОЭНЗИМОВ АЛАНИН- И ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ

М. Б. АТАНЕСЯН, М. А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Выявлены 2 изоэнзима глутаматдегидрогеназы и 1 аланиндегидрогеназы. Изучено изменение изоэнзимного спектра при репрессии биосинтеза отдельных изоэнзимов. Сделано заключение о существовании катаболических и анаболических изоэнзимов изученных дегидрогеназ.

Сокращения: ТНС—тетразоль нитроэний; АДГ—аланиндегидрогеназа; ГЛД—глутаматдегидрогеназа; ФМС—феназинметосульфат; ФМЗ—фармазон

Հայտնաբերվել է և զրոստանագենիդրոգենազայի 2 և արանինդենիդրոգենազայի 1 իզոֆերմենտներ: Ուսումնասիրվել է իզոֆերմենտային սպեկտրի փոփոխությունը՝ առանձին իզոֆերմենտներ հեշելիս: Չեռնոբյան է արվել, որ դոսոբյան ունեն լուսոմնասիրած ղենիդրոգենազաների կատարելի և անարտիկ իզոֆերմենտներ:

Two glutamate dehydrogenase (isoenzymes) and one alanine dehydrogenase (coenzyme) is revealed. The change of isoenzymatic spectrum is studied during the repression of biosynthesis of separate isoenzymes. It is concluded that there are anabolic and catabolic isoenzymes of the studied dehydrogenases.

Дрожжи—изоэнзимы аланин- и глутаматдегидрогеназы.

Ранее было показано, что гомогенаты дрожжей *Candida guilliermondii* содержат АДГ и ГДГ катализирующие реакции восстановительного аминирования пирувата и α -кетоглутарата, а также окислительного дезаминирования α -аланина и α -глутамата. В указанных реакциях в качестве коферментов выступают НАД и НАДФ [1, 3]. Была также доказана их субстратная индукция как в отношении катаболических, так и анаболических изоферментов [2, 4]. Целью настоящей работы являлось выявление изоэнзимного спектра указанных дегидрогеназ методом их разделения электрофорезом на полиакриламидном геле.

Материал и методика. Объектом исследования являлись дрожжи *C. guilliermondii* штамм У-42, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР, от проф. В. И. Кудрявцева. Методика выращивания дрожжей, получение гомогената и бесклеточного экстракта описаны в предыдущих работах [1, 3, 6].

Для определения ферментативной активности по реакции восстановления α -аланина и α -глутамата использовали реакционную смесь, содержащую 2,5 мкМ аминокислот, 2,5 мкМ НАДН, растворенных 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4), и 1 мл дрожжевого экстракта супернатанта, содержащего 1 мг белка, определяемого по Лоури [9].

Общий объем смеси—3 мл. Ферментативную активность определяли по приближенно оптической плотности восстановленного НАДН при 340 м μ и спектрофотометре СФ-4 (эквивент-1,0) в течение 3 минут.

Контрольные пробы содержали все компоненты, за исключением аминокислот. Для выяснения способности изучаемых ферментных систем к индукции использовали бюксесу, выращенную на среде с α -аланином или α -глутамином (α -аланин 419 мг, α -глутамат 693 мг). Разделение изоферментов аланин- и глутаматдегидрогеназы проводили методом диск-электрофореза на полиакриламидном геле.

Диск-электрофорез проводили по методу Дэвиса и Орнштейна в стеклянных трубках (90 \times 5 мм), заполненных системой из двух гелей—крупнопористого (2,5%) и мелкопористого (7,5%). Оба геля подвергали фотополимеризации в течение 20 мин. Исследуемые образцы наносили на поверхность мелкопористого геля из расчета 100–150 белков на каждую трубку.

После электрофореза судили по движению полосы бромфенолового. По окончании электрофореза столбики геля извлекали из трубочек, споласкивали дистиллированной водой и специфически окрашивали для проявления дегидрогеназ тетразолевым методом. Полосы, содержащие фермент, проявляли по методу Термена. Для этого столбики геля инкубировали в реакционной смеси, содержащей 10^{-3} М, α -глутамином или α -аланином, 10^{-4} М НАД или НАДФ, 0,01 мг ТНС, 0,1 мг ФМС и 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,4).

Инкубацию проводили при 37°. В процессе инкубации субстраты диффундировали в геле, и в том месте, где располагалась ГДГ происходило окислительное дезаминирование глутамата. Электроны, полученные НАД или НАДФ, передавались через ФМС на ТНС, который при этом из окисленной лейкоформы превращался в восстановленный ярко окрашенный продукт—ФМЗ. Поскольку формазин не растворяется, он

остается на месте протекания реакции, образуя окрашенную в темно-синий цвет узкую полосу на столбике геля. По числу таких полос можно судить о количестве изоферментов.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что при электрофорезе экстрактов дрожжей, выращенных на сульфате аммония, являющемся единственным источником азота, проявляется два четко выраженных диска глутаматдегидрогеназной активности изоэнзимов. В экстрактах дрожжей, выращенных на аланине, являющемся единственным источником азота, проявляются те же два диска изоэнзимов глутаматдегидрогеназы. При выращивании же дрожжей на α -глутамате, являющемся единственным источником азота, проявляется лишь один изоэнзим, более выраженный по сравнению с таковыми предыдущих вариантов.

Таким образом, можно заключить, что у адаптированных к глутамату дрожжей репрессируется биосинтез одного из двух изоэнзимов глутаматдегидрогеназы. По-видимому, в последнем случае появляется биосинтез анаболического изоэнзима и, напротив, индуцируется биосинтез катаболического.

Следует, однако, отметить, что указанные анаболические и катаболические изоэнзимы ГДГ в наших экспериментах проявились при использовании НАДФ (или НАД), тогда как, согласно литературным и нашим данным, анаболические и катаболические изоэнзимы различаются коферментной специфичностью, а именно тем, что НАДФН-зависимый изоэнзим несет анаболическую, а НАД-зависимый изоэнзим катаболическую функцию. Вероятно, проявление активности обоих изоэнзимов с использованием одного кофермента (НАД или НАДФ) обусловлено тем, что изоферменты, имея преимущественную специфичность в отношении одного из коферментов, способны, однако, проявлять определенную активность и в отношении другого кофермента. Экстракта дрожжей, выращенных на сульфате аммония, содержат лишь один диск аланин-дегидрогеназной активности, который сохраняется на электрограмме экстракта дрожжей, выращенных на α -глутамате, а другая электрограмма экстракта дрожжей, выращенных на α -аланине, не содержит диск с аланиндегидрогеназной активностью.

Можно заключить, что в последнем варианте репрессируется биосинтез аланиндегидрогеназы, имеющей, очевидно, анаболическую функцию.

Из приведенных электрограмм видно, что примененным методом электрофореза в экстрактах не удалось выявить катаболический изоэнзим аланиндегидрогеназы. Можно предположить, что это связано с инактивированием изоэнзима в ходе электрофореза, неизбежно сопровождающимся повышением температуры. Это предположение приобретает еще большую вероятность в связи с литературными данными относительно высокой лабильности аланиндегидрогеназы у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вследствие этого не поддающейся очистке (Краузе и др.) [6].

Лабильность аланиндегидрогеназы была подтверждена и в последующих экспериментах, когда экстракты дрожжей до электрофореза подвергались фракционированию на колонках сефадекса G-25 с целью отделения низкомолекулярных соединений от белковой фракции. При этом аланиндегидрогеназная активность в отличие от глутаматдегидрогеназной значительно снижалась, а после электрофореза полностью не активировалась. По всей вероятности, в растворимой фракции клетки содержались низкомолекулярные факторы (возможно, коферменты, субстраты и др.), утрата которых при гельфильтрации обуславливала дестабилизацию аланиндегидрогеназы.

При электрофоретическом фракционировании экстрактов дрожжей выявляется два изофермента глутаматдегидрогеназы и один аланиндегидрогеназы. При выращивании дрожжей на α -глутамате репрессируется один из изоферментов глутаматдегидрогеназы, очевидно, анаболический изофермент, а при выращивании на α -аланине репрессируется аланиндегидрогеназа, вероятно, анаболический изофермент.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лачинян Л. Е., Атанесян М. Б. Биолог. ж. Армении, 39, 2, 1986.
2. Атанесян М. Б., Лачинян Л. Е. Биолог. ж. Армении, 32, 12, 1979.
3. Атанесян М. Б., Лачинян Л. Е. Биолог. ж. Армении, 32, 14, 1979.
4. Давтян М. А., Атанесян М. Б., Лачинян Л. Е. Биолог. ж. Армении, 25, 10, 1975.
5. Атанесян М. Б., Лачинян Л. Е. Биолог. межузовск. сб. научн. тр., 1, 118, 1979.
6. Краузе Е. Н., Кретович В. Биохимия, 30, 2, 331, 1975.
7. Ehmke A., Hartmann Th. Phytochemistry, 15, 11, 1041, 1976.
8. Towle M. O., Boulter D. Plants, 134, 1, 97, 1977.
9. Kim E., Pitt P. Biochem. J., 161, 2, 1977.
10. Ehmke A., Hartmann Th. Phytochemistry, 174, 637, 1978.

Поступило 9.11.1989г